

PENGARUH KAFEIN TERHADAP PENAMPILAN REPRODUKSI DAN PERKEMBANGAN SKELETON FETUS MENCIT (*Mus musculus L.*)

Heri Budi Santoso*

** Program Studi Biologi FMIPA Universitas Lambung Mangkurat
Jl. A.Yani Km. 36 Banjarbaru Kalimantan Selatan*

ABSTRACT

The objectives of this study is to identify the effects of gavagely ingested caffeine on the reproductive performance and skeletal development during organogenesis of pregnant dams strain DDY. Between the 6th to 15th day of gestation, four groups of dams that composed of 24 pregnant mice had been treated gavagely with 0, 40, 80, and 120 mg/kg body weight of caffeine, respectively. On the 18th day of gestation, fetuses were removed from the dams by caecarean section in order to observe the survive, death, and resorption of fetuses, and to observe fetal morphological defect and skeletal development. The latter observation were that prepared by 3 sequential treatments including 96 % alcohol fixation, Inouye's method preparation, and alcian blue-alizarin red S staining. Data analysis on the weighth of fetal and the numbers of the internode of sternum, metacarpus, metatarsus of fetal were done with Anava and Duncan Multiple Range Test. Meanwhile, the numbers of morphological defected fetuses were statistically analised with Chi-square test. Results of this study demonstrated that caffein caused the death and resorption of fetuses. In addition, the caffein treated fetuses showed hemorrhage, club foot, costae bridge, and crooked tail. Caffeine treatment at the dosage of 120 mg /kg bw/day resulted in the delay of the sternum, metacarpus, tibia, and metatarsus ossification.

Keywords : caffein, organogenesis, reproductive performance and skeletal development, fetuses

PENDAHULUAN

Sejak ditemukan tiga kasus cacat pada bayi di Amerika Serikat, yaitu ekstrodaaktili dari ibu yang mengkonsumsi kopi antara 19 – 30 mg/kg bb/hari selama kehamilannya, maka semakin kuat kecurigaan efek teratogenik kafein pada manusia (Jacobson dkk, 1981). Semenjak itu, penelitian tentang efek teratogenik kafein merupakan bahan penelitian yang menarik.

Menurut Gilbert & Rice (1991), kafein merupakan zat kimia yang berpotensi menyebabkan gangguan perkembangan janin, tetapi masih dikonsumsi oleh sebagian besar ibu hamil di Amerika Serikat. Kenyataan serupa mungkin juga terjadi di Indonesia. Selain itu, kafein memiliki sifat sebagai agensia teratogenik yang tidak spesifik sehingga dimungkinkan menyebabkan timbulnya jenis cacat lain yang dijumpai pada berbagai sistem organ.

Penelitian yang pernah dilakukan oleh Foreman (1998) pada 2500 orang wanita yang mengkonsumsi kopi dengan kandungan kafein lebih dari 300mg didapatkan 17% dari wanita tersebut mengalami kegagalan konsepsi. Konsumsi kafein yang berlebihan menurut Foreman juga mengakibatkan efek yang membahayakan pada sistem reproduksi wanita yaitu infertilitas, keguguran dan prematuritas serta berat badan lahir rendah pada bayinya.

Penelitian yang pernah dilakukan pada mencit, kafein terbukti menyebabkan cacat berupa ekstrodaaktili, celah langit – langit mulut, dan hematoma (Kawana dkk., 1988). Selain itu, Faisal dkk. (2001) melaporkan bahwa kafein juga menyebabkan nekrosis pada sel hepar dan sel tubulus renalis fetus mencit.

Taylor (1986) menyatakan bahwa untuk mengevaluasi batas aman penggunaan zat kimia

oleh wanita hamil maka uji keteratogenikan sangat diperlukan. Pada uji tersebut dilakukan pengamatan terhadap penampilan reproduksi, kelainan morfologi dan skeleton, serta histopatologi. Termasuk penampilan reproduksi meliputi jumlah fetus hidup, jumlah embrio yang diresorpsi, jumlah fetus mati, dan berat badan fetus. Termasuk kelainan morfologi meliputi cacat makroskopis pada tubuh fetus. Sedangkan kelainan skeleton meliputi pemeriksaan terhadap sistem rangka. Diduga kafein dapat menghambat proses osteogenesis dan potensial menyebabkan kelainan perkembangan embrio.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek pemberian kafein secara oral pada induk mencit bunting selama masa organogenesis pada penampilan reproduksi dan perkembangan skeleton fetus.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan pola percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dengan enam kali perulangan per perlakuan. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung pada bulan Juni sampai dengan Agustus 2004. Pemeliharaan hewan percobaan, pengamatan, pembuatan, dan pemotretan fotomikrograf preparat rangka fetus dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Unlam Banjarbaru.

Hewan percobaan yang digunakan ialah 24 ekor mencit betina galur DDY dengan berat badan rata-rata 28 gram, umur 3 bulan, belum pernah bunting, memiliki siklus estrus teratur, dan sehat. Mencit diperoleh dari Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Wilayah V Banjarbaru Kalimantan Selatan. Mencit dengan umur kebuntingan hari ke-6 dibagi dalam 4 kelompok berdasarkan dosis kafein. Dosis kafein untuk masing – masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut : kelompok I (kontrol): 0,5 ml Na Cl fisiologis; kelompok II: 40 mg kafein /kg bb/hari; kelompok III: 80 mg kafein/kg bb/hari; dan kelompok IV:120 mg kafein/kg bb/hari. Kafein diberikan selama 10 hari, yaitu mulai kebuntingan hari ke-6 sampai dengan kebuntingan hari ke-15 (masa organogenesis). Pemberian kafein dilakukan secara oral dengan menggunakan spuit injeksi 1 cc.

Dosis yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan hasil konversi dosis maksimal yang digunakan oleh manusia ke mencit mengikuti tabel konversi perhitungan dosis antar jenis hewan menurut cara Laurence & Bacharach (1964, dalam Ngatijan, 1991). Konsumsi kafein pada manusia menurut Asthon (1987) adalah (200 – 2000) mg/hari. Pada penelitian ini dosis kafein dibatasi antara (300 – 950) mg/hari. Angka konversi tersebut diperoleh dosis minimal kafein untuk mencit (20) g = 0,0026. Berdasarkan angka konversi tersebut diperoleh dosis minimal kafein untuk mencit (20)g = 0,0026 x 300 mg = 0,78 mg/20g bb/hari atau 39 mg/kg bb/hari (dibulatkan menjadi 40 mg/kg bb/hari). Berdasarkan dosis minimal untuk tiap kgbb mencit ditentukan dosis perlakuan, yaitu 40 mg kafein/kgbb/hari; 80 mg/kgbb/hari; dan 120 mg/kgbb/hari. Berat mencit yang digunakan adalah berat pada kebuntingan hari ke - 6. Sehingga berdasarkan angka konversi tersebut diperoleh dosis (300-950) mg kafein/hari pada manusia menjadi (40-120) mg kafein/hari untuk mencit.

Pengamatan fetus dilakukan pada kebuntingan hari ke-18 dengan cara pembedahan pada bagian perut untuk mengeluarkan fetus dari uterus. Pengamatan dilakukan terhadap :

1. Penampilan Reproduksi Mencit

Data yang diambil meliputi jumlah fetus hidup dari uterus kanan dan kiri, jumlah fetus mati dan jumlah resorpsi serta berat fetus. Fetus hidup dimasukkan ke dalam NaCl 0,9%. Menurut Taylor (1986) penurunan berat fetus pada hewan percobaan dibandingkan kontrol merefleksikan terjadi hambatan pertumbuhan secara umum

2. Morfologi Fetus

Morfologi fetus yang diamati meliputi kelengkapan dan kelainan yang tampak pada tungkai depan dan belakang, ekor, telinga, mata, bibir, langit-langit mulut, dan perdarahan bawah kulit. Pengamatan menggunakan kaca pembesar. Penimbangan dilakukan setelah fetus dibersihkan dari cairan amnion yang membungkusnya. Pengamatan kecacatan/kelainan struktur kerangka anggota sumbu dan kerangka anggota tubuh dilakukan dengan berpanduan pada buku Practical

teratology (Taylor, 1986), Drug effects on the fetus (Tuchmann-Duplessis, 1975), Environment & birth defects (Wilson, 1973), The Atlas of mouse development (Kaufmann, 1992) serta Advances in teratology (Wollam, 1967).

3. Perkembangan Skeleton

Setelah dilakukan pengamatan morfologi luar, sebagian fetus hidup sekelahiran difiksasi dalam alkohol 96%, selanjutnya dilakukan preparasi skeleton dengan pewarnaan *Alcian Blue – Alizarin Red S* menurut Metode Inouye (1976). Pengamatan perkembangan skeleton meliputi: pertumbuhan skeleton secara umum, perkembangan kerangka sumbu seperti vertebra, kosta, dan sternum, dan perkembangan kerangka anggota tubuh seperti perkembangan metacarpus dan metatarsus.

Data hasil penelitian yaitu berat fetus dan perkembangan kerangka sumbu dan kerangka anggota tubuh dianalisis dengan analisis varians pola searah dan dilanjutkan dengan Duncan Multiple Range Test (DMRT) (Gaspersz, 1991). Jumlah fetus

resorpsi, jumlah fetus mati, serta cacat morfologi yang terjadi dianalisis dengan uji Kai Kuadrat (Saleh, 1996). Struktur kosta dan vertebra diamati secara deskriptif kualitatif terhadap terjadinya cacat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Efek Kafein pada Penampilan Reproduksi Fetus Mencit

Pada penelitian ini, kematian dan resorpsi fetus hanya ditemukan pada kelompok perlakuan IV (dosis 120mg/kg bb/hari), yaitu sebanyak 4 ekor fetus mati (11,11%) dan 6 ekor resorpsi fetus (16,67%) (Tabel 1). Resorpsi fetus sebanyak 6 ekor hanya terjadi pada 2 ekor induk, sedangkan 4 ekor induk lainnya dalam kelompok yang sama tidak menunjukkan resorpsi, demikian juga dengan kematian fetus. Kematian fetus hanya ditemukan pada 2 ekor induk.

Tabel 1. Pesentase jumlah fetus hidup, fetus mati dan fetus resorpsi dari induk setelah diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Jumlah induk (ekor)	Jumlah fetus (ekor)			% mati	% resorpsi
			Hidup	Mati	Resorpsi		
I	0	6	60	0	0	0	0
II	40	6	58	0	0	0	0
III	80	6	54	0	0	0	0
IV	120	6	36	4	6	11,11	16,67

Pada pengamatan terhadap morfologi fetus yang mati, menunjukkan berat dan panjang yang lebih kecil daripada fetus normal. Hal ini diduga pada fetus yang mati sejak dalam kandungan belum selesai mengalami perkembangan. Kematian fetus yang tidak terjadi pada setiap induk berhubungan dengan kemampuan yang berbeda-beda pada masing-masing induk dalam memetabolisme kafein. Resorpsi fetus sebanyak 3 ekor dari seekor induk mencit disajikan pada gambar 2.

Analisis statistik dengan uji Kai Kuadrat menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna

($P < 0,05$) antara fetus hidup dari kelompok kontrol dengan fetus yang mati dari kelompok perlakuan IV. Demikian juga untuk jumlah fetus yang mengalami resorpsi. Setelah dilakukan analisis statistik dengan uji Kai Kuadrat antara kelompok perlakuan IV dengan kelompok kontrol, antara fetus yang mengalami resorpsi dengan fetus hidup ternyata menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$).



Gambar 2. Uterus induk mencit umur kebuntingan hari ke 18 yang diberi kafein dosis 120 mg/kg bb/hari dengan fetus normal dan embrio yang diresorpsi (→)

Pada penelitian ini ditemukan resorpsi fetus sebanyak 6 ekor (16,67%), tetapi secara statistik bermakna. Kenyataan ini menegaskan bahwa kafein mempunyai efek embriotoksik. Efek embriotoksik kafein pada penelitian ini muncul pada dosis 120 mg/kg bb/hari, yaitu berupa kematian fetus intrauterin dan resorpsi fetus. Resorpsi fetus yang ditemukan dalam penelitian ini merupakan kematian embrio sejak dini yang ditunjukkan dengan adanya sisa jaringan embrio dalam uterus.

Fetus yang mengalami resorpsi diduga disebabkan oleh kafein yang dikonsumsi oleh induk dalam jumlah besar, yaitu melebihi dari konsumsi yang sewajarnya, sehingga dapat memunculkan efek embriotoksik. Dosis kafein 120mg/kg bb/hari pada mencit jika dikonversikan ke manusia adalah 950 mg/kg bb/hari atau setara dengan konsumsi 11 cangkir kopi perhari, jika 1 cangkir kopi berisi 85 mg kafein. Hal ini sesuai dengan pendapat Harbinson (1980) yang menyatakan bahwa agensia yang bersifat teratogenik dapat menimbulkan kematian intrauterin yang diikuti dengan abortus spontan dan resorpsi. Menurut Wilson (1973), bahwa dalam kisaran dosis embriotoksik, semakin tinggi tingkatan dosis akan mengakibatkan terjadinya respon yang tingkatannya lebih tinggi. Akibat tersebut berkisar dari penghambatan pertumbuhan, malformasi sampai kematian intrauterin dan

resorpsi. Selain itu sebenarnya penyebab yang pasti kematian fetus sulit diketahui.

Menurut Sakamoto dkk. (1993), efek embriotoksik kafein disebabkan karena kafein dan metabolitnya dengan cepat mampu melintas sawar plasenta menuju embrio, terakumulasi dalam jaringan fetus, cairan amnion dan pembuluh darah umbilikalis dengan konsentrasi sama dengan konsentrasi pada plasma induk, karena tidak adanya enzim yang memetabolisme kafein pada fetus. Akumulasi kafein dalam sel dan jaringan tubuh fetus bertambah banyak dengan adanya peningkatan waktu paruh kafein pada masa kebuntingan, yaitu sampai 3 kali lipat dari masa tidak bunting. Hal ini terjadi karena metabolisme kafein berjalan sangat lambat pada masa kebuntingan (Baillargeon & Desrosiers, 1987). Adanya akumulasi kafein ini potensial bersifat embriotoksik dan teratogenik, sehingga menyebabkan kematian di dalam uterus yang biasanya diikuti dengan abortus atau resorpsi.

B. Efek Kafein pada Morfologi Fetus Mencit

Dari hasil pengamatan secara makroskopik tidak dijumpai cacat atau kelainan morfologi yang ekstrim. Kelainan

yang ada hanya berupa perdarahan bawah kulit, kaki torsi dan ekor bengkok.

1. Berat dan panjang fetus

Pada penelitian ini dilakukan analisis berat dan panjang fetus karena cacat bawaan dapat menyebabkan penurunan berat dan panjang fetus. Meskipun variabel berat badan kurang mendapat perhatian yang memadai dari para peneliti selama ini, tetapi diakui bahwa adanya penurunan berat badan merupakan perwujudan dari adanya abnormalitas pertumbuhan baik pada manusia maupun pada hewan percobaan. Penurunan berat dan panjang fetus merupakan bentuk teringan dari Tabel 2. Rerata berat dan panjang fetus menciit dari induk setelah diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

efek agensia teratogenik dan merupakan parameter yang sensitif (Wilson, 1973).

Hasil pengamatan terhadap berat dan panjang fetus menunjukkan fetus pada kelompok kontrol memiliki berat rata-rata sebesar 1,57g dan panjang rata-rata 24,17mm. Pada kelompok perlakuan II (dosis 40mg/kg bb/hari) rata-rata berat fetus sebesar 1,37g dan rata-rata panjang fetus 21,45mm, kelompok perlakuan III (dosis 80mg/kg bb/hari) rata-rata berat fetus sebesar 1,30g dan rata-rata panjang fetus 21,12mm; dan kelompok perlakuan IV (dosis 120mg/kg bb/hari) rata-rata berat fetus sebesar 0,92g dan rata-rata panjang fetus 17,76mm (Tabel 2).

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Jumlah induk (ekor)	Jumlah fetus (ekor)	Berat (g)	Panjang (mm)
I	0	6	60	1,57 ^a	24,17 ^a
II	40	6	58	1,37 ^a	21,45 ^b
III	80	6	54	1,30 ^b	21,12 ^b
IV	120	6	40	0,92 ^c	17,76 ^c

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang bermakna

Analisis statistik dengan Anava menunjukkan ada perbedaan bermakna ($P < 0,05$) antara berat dan panjang fetus kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Terlihat pada tabel 5, semakin tinggi dosis kafein semakin ringan berat dan semakin pendek ukuran panjang fetus. Hal ini merupakan indikasi adanya gangguan pertumbuhan. Menurut Wilson (1973) beberapa zat kimia yang selain dapat mengakibatkan kematian dan malformasi fetus, juga dapat menyebabkan hambatan pertumbuhan, tergantung dosis dan waktu pemberian. Dari pengamatan di lapangan, terbukti bahwa individu yang mengalami malformasi pada umumnya lebih kecil jika dibandingkan individu normal. Oleh karena itu sebelum menyatakan adanya abnormalitas pada suatu individu seperti misalnya pelebaran sutura tengkorak, penurunan jumlah ruas sternbrae, metatarsus, metacarpus, kosta atau vertebrae, berat hewan tersebut harus dibandingkan dulu dengan kontrol untuk memastikan bahwa hambatan pertumbuhan tersebut merefleksikan adanya

hambatan pertumbuhan secara umum. Di lain pihak, perlu diperhatikan bahwa beberapa agen teratogen dapat mengakibatkan kelainan viseral maupun skeletal tanpa menunjukkan adanya kelainan eksternal. Karenanya semua fetus yang diteliti, setelah diamati secara makroskopik harus difiksasi untuk studi lebih lanjut terhadap struktur internalnya.

Menurut Caan & Goldhaber (1989), penurunan berat badan fetus ini berkaitan erat dengan konsumsi kafein pada induk. Penurunan ukuran fetus ini pada manusia baru muncul pada konsumsi tinggi (diatas 300mg/hari), sementara pada konsumsi rendah sampai moderat (sampai 300mg/hari) tidak dijumpai adanya penurunan ukuran fetus. Pada penelitian ini, penurunan ukuran fetus sudah tampak pada dosis yang paling rendah yaitu dosis 40mg/kg bb/hari, yang setara dengan dosis 300mg kafein/kg bb/hari pada manusia.

Sakamoto dkk. (1993) menyatakan bahwa efek negatif kafein terhadap fetus terjadi

karena kafein dalam sirkulasi fetus diperpanjang waktu paruhnya. Perpanjangan waktu paruh ini terjadi karena fetus tidak memiliki enzim detoksifikasi yang memetabolisme kafein sehingga kemungkinan besar kafein bersifat embriotoksik atau teratogenik pada fetus.

2. Perdarahan bawah kulit

Perdarahan bawah kulit dijumpai mulai pada kelompok perlakuan II (dosis 40mg/kg bb/hari) yaitu sebanyak 2 ekor (3,45%), kelompok perlakuan III (dosis 80mg/kg bb/hari) sebanyak 7 ekor (12,96%) dan pada kelompok perlakuan IV (dosis 120mg/kg bb/hari) sebanyak 10 ekor (25%). Data selengkapnya disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Persentase jumlah fetus yang mengalami perdarahan bawah kulit dari induk setelah diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

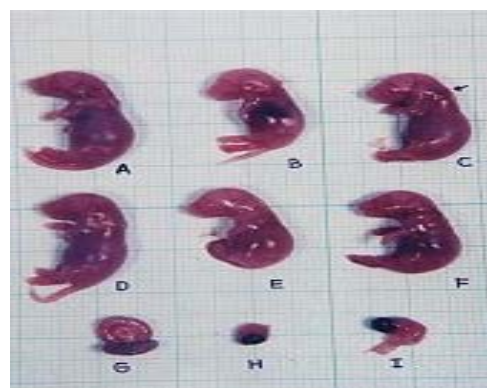
Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Jumlah fetus yang diamati (ekor)	Jumlah fetus dengan perdarahan bawah kulit (ekor)	%
I	0	60	0	0
II	40	58	2	3,45
III	80	54	7	12,96**
IV	120	40	10	25,00**

Hasil uji Kai Kuadrat dibanding kontrol

** = berbeda sangat nyata

Perdarahan bawah kulit yang teramati bervariasi baik besar, jumlah maupun letaknya. Perdarahan dijumpai di daerah perut, leher dan tungkai depan. Banyaknya perdarahan pada satu ekor fetus dapat lebih dari satu tempat dengan diameter berkisar antara 1mm sampai 10mm (Gambar 3 dan Gambar 4c). Menurut Price & Wilson (1984) perdarahan adalah keluarnya darah dari sistem kardiovaskuler dan disertai penimbunan di dalam ruangan tubuh atau di dalam jaringan tubuh.

Ada beberapa mekanisme yang memungkinkan untuk terjadinya perdarahan. Salah satu diantaranya akibat ketidakseimbangan osmose, yaitu karena adanya gangguan tekanan dan viskositas cairan pada bagian fetus yang berbeda yaitu antara plasma darah dan ruang ekstrakapiler atau antara cairan ekstraembrionik dan intraembrionik.



Gambar 3. Fotomakrograf fetus seekor induk mencit setelah diberi kafein secara oral dengan dosis 120mg/kg bb/hari selama masa organogenesis

- A dan D : fetus normal
- B : fetus dengan perdarahan bawah kulit pada bagian perut
- C : fetus dengan perdarahan bawah kulit pada bagian leher
- E : fetus dengan berat badan rendah
- F : fetus dengan perdarahan bawah kulit pada bagian perut dan tungkai depan
- G,H,I : fetus yang mengalami resorpsi

Pada keadaan normal embrio berkembang dalam cairan amnion yang isotonis dengan cairan tubuh. Ketidakseimbangan tekanan osmose kedua cairan itu menyebabkan perdarahan dan edema. Adanya zat asing dalam jaringan dapat menyebabkan perubahan tekanan osmose (Wilson, 1973).

Menurut Wilson (1973), perdarahan juga dapat disebabkan oleh adanya vasokonstriksi. Vasokonstriksi dapat menyebabkan tekanan darah meningkat sehingga pembuluh darah pecah dan akhirnya terjadi perdarahan. Kenaikan tekanan darah dapat juga distimulasi oleh adanya larutan hipertonik yang sampai ke fetus, yang akhirnya dapat pula menyebabkan perdarahan.

Perdarahan yang terjadi dalam penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh adanya perubahan keseimbangan osmose yang mengakibatkan berubahnya tekanan cairan dan viskositas dalam bagian tubuh fetus yang berbeda, yaitu antara cairan ekstraembrionik dengan intraembrionik.

Tabel 4. Persentase jumlah fetus dengan cacat berupa tungkai torsi dari induk setelah diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Jumlah fetus yang diamati (ekor)	Jumlah fetus dengan tungkai torsi (ekor)	%
I	0	60	0	0
II	40	58	0	0
III	80	54	0	0
IV	120	40	3	7,5

Setelah dilakukan uji Kai Kuadrat antara kelompok perlakuan IV dengan kelompok kontrol ternyata menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Tungkai belakang torsi pada bagian sebelah kanan dapat dilihat pada gambar 4E dan 4F.

Keadaan ini akan berlanjut menjadi sindrom edema. Adanya sindrom edema ini akan menyebabkan terjadinya perdarahan. Biasanya, sindrom edema ini terjadi akibat adanya hipoksia yang berkepanjangan. Terjadinya kondisi hipoksia diduga karena akumulasi kafein dalam plasenta sehingga terjadi penurunan suplai darah menuju vili plasenta yang akhirnya mengakibatkan berkurangnya pemenuhan kebutuhan oksigen dalam jaringan fetus.

3. Tungkai belakang torsi

Dari hasil pengamatan secara makroskopik, pada kelompok perlakuan IV (dosis 120mg/kg bb/hari) dijumpai cacat berupa tungkai torsi pada tungkai belakang sebelah kanan sebanyak 3 ekor (7,5%) (Tabel 4)

4. Ekor bengkok

Hasil pengamatan secara makroskopik dijumpai cacat berupa ekor bengkok pada kelompok perlakuan IV (dosis 120mg/kg bb/hari) sebanyak 3 ekor (7,5%) (Tabel 5).

Tabel 5. Persentase jumlah fetus dengan cacat berupa ekor bengkok dari induk setelah diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Jumlah fetus yang diamati (ekor)	Jumlah fetus dengan ekor bengkok (ekor)	%
I	0	60	0	0
II	40	58	0	0
III	80	54	0	0
IV	120	40	3	7,5

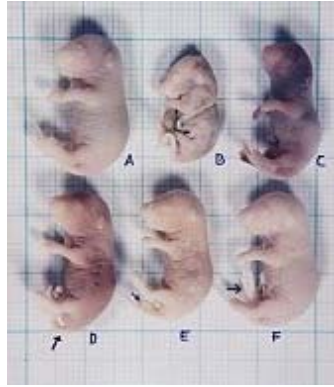
Analisis statistik dengan uji Kai Kuadrat antara kelompok perlakuan IV dan kelompok kontrol ternyata menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Ekor bengkok dapat dilihat pada gambar 4D dan gambar 5B.

Pada fetus yang mengalami ekor bengkok terlihat secara mikroskopik terjadi kelainan pada vertebra ekor, yaitu berupa ukuran vertebra yang lebih kecil dan jarak antar vertebra saling berhimpitan (Gambar 5). Diduga kelainan ini telah dimulai sejak awal pembentukan blastema vertebra.

Menurut Stazi dkk. (1992) pembentukan vertebra telah dimulai sejak fetus usia kebuntingan 10 hari. Pada saat ini sel-sel mesenkim dari sklerotom bermigrasi ke arah medial mengelilingi korda dorsalis dan selanjutnya berkembang menjadi blastema *centrum* dari satu vertebra. Tiap *centrum* dibangun oleh sel-sel yang berasal dari somit yang berurutan. Apabila ada hambatan terhadap migrasi mesenkim dari salah satu arah, maka struktur *centrum* yang terbentuk dapat mengalami kelainan. Kelainan pada *centrum* berupa ukuran yang lebih kecil dan jarak saling berhimpitan. Kelainan tersebut menyebabkan *arcus* dan *processus* yang terletak dan merupakan tonjolan dari *centrum* terhambat pertumbuhannya. Terhambatnya pertumbuhan *centrum*, *arcus*, dan *processus* menyebabkan ukuran vertebra ekor menjadi kecil dan menurunnya ketegaran vertebra ekor sehingga dimungkinkan terjadinya pembengkokan yang berlebihan dari vertebra ekor. Kemungkinan kafein menghambat pembentukan awal vertebra ekor sehingga menimbulkan kelainan.

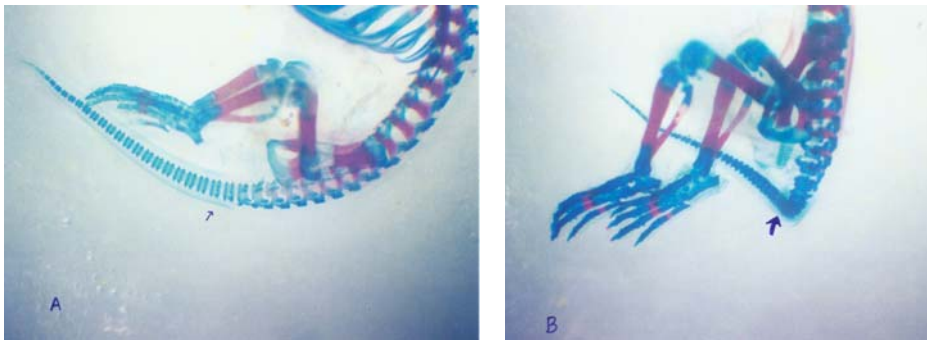
Dalam penelitian ini cacat berupa tungkai belakang torsi dan ekor bengkok diduga disebabkan oleh terhambatnya osteogenesis pada kedua organ tersebut. Hambatan tersebut disebabkan oleh terhambatnya mitosis pada sel-sel kartilago yang berperan dalam osteogenesis tungkai belakang dan ekor.

Mekanisme secara seluler terjadinya tungkai torsi dan ekor bengkok diduga melalui hambatan mitosis sel-sel kartilago pada proses osteogenesis. Hambatan tersebut melalui mekanisme cAMP yang mengontrol mitosis. Pozner dkk. (1986) menyatakan bahwa pertumbuhan sel berhubungan dengan konsentrasi cAMP di dalam sel tersebut. Adanya reduksi konsentrasi cAMP di dalam sel dan jaringan akan meningkatkan tingkat pertumbuhan sel, sebaliknya peningkatan konsentrasi cAMP di dalam sel dan jaringan akan menurunkan tingkat pertumbuhan sel, dan pada peningkatan konsentrasi cAMP yang tinggi dapat menyebabkan hambatan akselerasi pertumbuhan. Selain itu, Beck & Urbano (1991) menambahkan bahwa kafein mampu menghambat aktivitas enzim fosfodiesterase yang menghidrolisis cAMP, sehingga perusakan cAMP tertunda yang akibatnya terjadi peningkatan konsentrasi cAMP di dalam sel dan jaringan. Diduga, peningkatan konsentrasi cAMP di dalam sel-sel yang berperan dalam osteogenesis tungkai belakang dan ekor akan menghambat osteogenesis pada kedua organ tersebut.



Gambar 4. Fotomakrograf kelainan morfologi fetus

- A. Morfologi fetus dari kelompok kontrol
- B. Fetus yang mati dari kelompok perlakuan IV (dosis 120mg/kg bb/hari)
- C. Fetus dengan perdarahan bawah kulit pada bagian leher dari kelompok Perlakuan II (dosis 40mg/kg bb/hari)
- D. Fetus dengan ekor bengkok (↑) dari kelompok perlakuan IV
- E-F Fetus dengan tungkai belakang sebelah kanan torsi



Gambar 5. Fotomikrograf ekor fetus

- A. Ekor normal dari kelompok kontrol
 - B. Ekor bengkok dengan ukuran vertebra yang lebih kecil dan jarak antar vertebra saling berhimpitan (kelompok perlakuan IV dosis 120mg/kg bb/hari)
- Perbesaran 16x

C. Efek Kafein pada Perkembangan Skeleton

Fetus Mencit

Perkembangan skeleton fetus mencit akibat kafein pada penelitian ini diamati secara mikroskopik. Pengamatan meliputi perkembangan *skeleton appendiculare* dan *skeleton axiale*, setelah skeleton diwarnai dengan *Alcian Blue 8 GS-Alizarin Red S*. Pada penelitian ini ruas yang mengalami penulangan atau kartilago yang telah mengalami penulangan akan berwarna merah

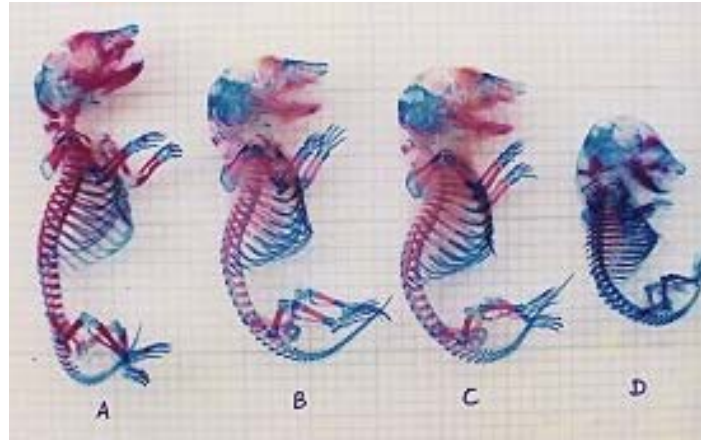
dengan *Alizarin Red S*, sedang kartilago akan terwarnai biru dengan *Alcian Blue*.

Hasil pengamatan terhadap skeleton fetus secara umum menunjukkan hambatan pertumbuhan dan perkembangan pada ruas tulang sternum, metacarpus, dan metatarsus sehingga jumlahnya menjadi lebih sedikit dibanding kontrol. Sedang, pertumbuhan ruas vertebrae tidak menunjukkan adanya hambatan. Pada kosta tidak terjadi hambatan pertumbuhan tulang, sebab pada semua kelompok perlakuan ditemukan kosta yang

berjumlah normal yaitu 13 ruas. Namun, ditemukan kelainan yang peneliti sebut sebagai “jembatan costae”, yaitu terbentuknya penulangan yang menghubungkan antara kosta yang satu dengan kosta yang lainnya. Gambaran skeleton fetus mencit secara umum dengan pengecatan *Alcian Blue-Alizarin Red* pada gambar 6. Penulangan ruas sternum, metacarpus, dan metatarsus disajikan pada tabel 6.

1. Sternum

Hasil pengamatan terhadap sternum fetus kelompok kontrol menunjukkan sternum terdiri atas (i) *presternum* atau *manubrium sterni*, terletak di bagian anterior; (ii) *mesosternum* terdiri atas 5 ruas *sternebra* yang terletak di tengah; (iii) *xiphisternum* terletak di posterior, pada ujung *xiphisternum* melekat *cartilago xiphoideus*.



Gambar 6. Gambaran skeleton fetus akibat kafein dengan pengecatan *Alcian Blue-Alizarin Red S*

- A. skeleton fetus dari kelompok kontrol
- B. skeleton fetus dari kelompok perlakuan II (dosis 40mg/kg bb/hari)
- C. skeleton fetus dari kelompok perlakuan III (dosis 80 mg/kg bb/hari)
- D. skeleton fetus dari kelompok perlakuan IV (dosis 120 mg/kg bb/hari)

Tabel 6. Persentase penulangan ruas sternum, metacarpus dan metatarsus fetus mencit dari induk yang diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

K	Dosis mg/kg bb/hari	Jumlah fetus (ekor)	Sternum			Metacarpus			Metatarsus		
			a	B	%	A	b	%	a	b	%
I	0	30	5	5	16,67	3	30	100	3	30	100
			6	25	83,33						
II	40	29	5	14	48,28	3	29	100	3	29	100
			6	15	51,72						
III	80	27	2	1	3,70	3	12	44,44	2	15	55,56
			3	1	3,70						
			4	10	37,04						
			5	15	55,56						
IV	120	20	0	2	10	0	4	20	0	1	3
			2	1	5						
			3	2	10	3	2	10			
			4	10	50						
			5	5	25						

Keterangan a : jumlah penulangan (ruas)

b : jumlah fetus yang penulangannya sebanyak a (ekor)

Pengamatan terhadap penulangan ruas sternum pada kelompok kontrol menunjukkan 83,33% memiliki 6 ruas sternum yang terdiri dari 5 ruas sternabrae dan 1 ruas xiphisternum, dan 16,67% memiliki 5 ruas sternum. Pada kelompok perlakuan II (dosis 40mg/kg bb/hari) menunjukkan fetus dengan 6 ruas sebanyak 51,72%, 5 ruas sebanyak 48,28%. Pada kelompok perlakuan III (dosis 80mg/kg bb/hari) menunjukkan fetus dengan 5 ruas sebanyak 55,56%, 4 ruas sebanyak 37,04%, 3 ruas

sebanyak 3,70%. Pada kelompok perlakuan IV (dosis 120 mg/kg bb/hari) menunjukkan 10% belum mengalami penulangan pada sternum, 2 ruas sebanyak 5%, 3 ruas sebanyak 10%, 4 ruas sebanyak 50% dan 5 ruas sebanyak 25%. Data selengkapnya disajikan pada tabel 6.

Pada penelitian ini untuk melihat efek kafein pada perkembangan sternum digunakan parameter rerata jumlah ruas sternum fetus (Tabel 7).

Tabel 7. Rerata jumlah ruas sternum yang mengalami penulangan pada fetus dari induk setelah diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Jumlah fetus yang diamati (ekor)	Jumlah penulangan sternum (ruas)
I	0	30	5,83 ^a
II	40	29	5,50 ^a
III	80	27	4,46 ^b
IV	120	20	3,60 ^c

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Tabel 7 memperlihatkan terjadi penurunan rerata jumlah ruas sternum seiring dengan meningkatnya dosis. Analisis statistik dengan uji Anava menunjukkan ada perbedaan bermakna ($p < 0,05$) rerata jumlah ruas sternum antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Uji lanjutan antar kelompok perlakuan dengan uji DMRT menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan, tetapi antar kelompok perlakuan II dan kelompok kontrol tidak ada perbedaan bermakna.

Pengamatan pada perkembangan sternum ini, fetus dianggap mengalami gangguan perkembangan dan pertumbuhan jika pusat penulangan sternabrae hanya terbentuk 5 ruas atau kurang. Sedangkan pertumbuhan dianggap normal jika terbentuk 6 ruas dengan perincian 5 ruas

sternabrae dan 1 ruas xiphisternum (Manson dkk., 1982).

2. Metacarpus

Pengamatan secara mikroskopis terhadap jumlah ruas metacarpus menunjukkan semua fetus pada kelompok kontrol 100% memiliki 3 ruas, demikian juga dengan kelompok perlakuan II (dosis 40 mg/kg bb/hari). Respon dosis pada penulangan metacarpus mulai tampak pada kelompok perlakuan III (dosis 80mg/kg bb/hari), yakni 44,44% fetus memiliki 3 ruas dan 55,56% memiliki 2 ruas. Pada kelompok perlakuan IV (dosis 120 mg/kg bb/hari) 10% memiliki 3 ruas, 70% memiliki 2 ruas, dan 20% fetus belum mengalami penulangan (Tabel 7). Rerata jumlah ruas metacarpus disajikan pada tabel 8.

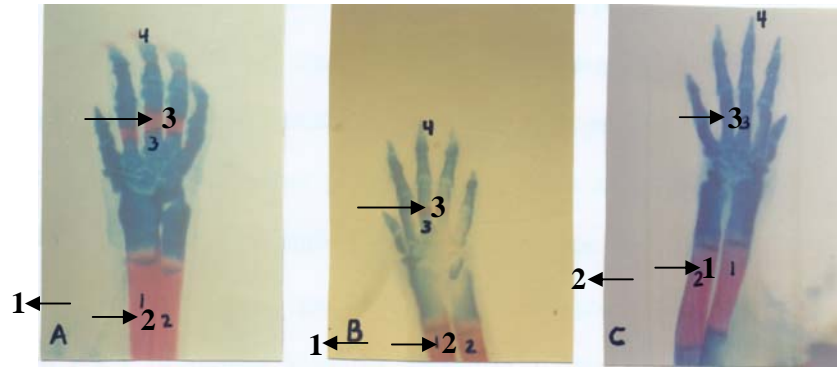
Tabel 8. Rerata jumlah ruas metacarpus yang telah mengalami penulangan pada fetus dari induk setelah diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Jumlah fetus yang diamati (ekor)	Jumlah penulangan metacarpus (ruas)
I	0	30	3,00 ^a
II	40	29	3,30 ^a
III	80	27	2,45 ^b
IV	120	20	1,69 ^c

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Analisis statistik dengan Anava menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) jumlah ruas metacarpus yang mengalami penulangan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Uji lanjutan antar kelompok perlakuan dengan uji DMRT menunjukkan perbedaan

bermakna ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan, tetapi antar kelompok perlakuan II dan kelompok kontrol tidak ada perbedaan bermakna. Penulangan metacarpus dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Fotomikrograf tungkai depan fetus akibat kafein
 A. penulangan metacarpus 3 ruas Keterangan: 1. radius 2. ulna
 B. penulangan metacarpus 2 ruas 3. metacarpus
 C. metacarpus belum mengalami penulangan Perbesaran 16x

3. Metatarsus

Hasil pengamatan secara mikroskopik terhadap jumlah ruas metatarsus menunjukkan semua fetus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan II (dosis 40mg/kg bb/hari) 100% memiliki 3 ruas. Respon dosis pada penulangan metatarsus mulai tampak pada kelompok perlakuan III (dosis 80mg/kg bb/hari) yakni 44,44% fetus

memiliki 3 ruas metatarsus dan 55,56% fetus memiliki 2 ruas metatarsus. Pada kelompok perlakuan IV (dosis 120mg/kg bb/hari) 50% fetus memiliki 3 ruas metatarsus, 45% fetus memiliki 2 ruas metatarsus, dan 5% belum mengalami penulangan pada metatarsusnya (Tabel 6). Rerata jumlah ruas metatarsus disajikan pada tabel 9.

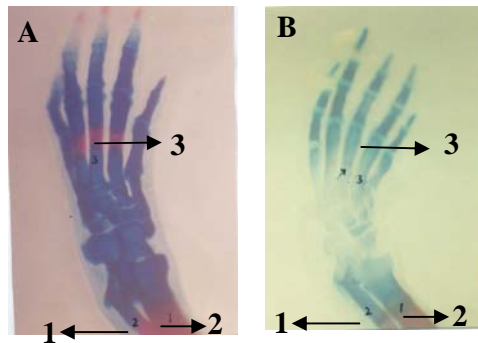
Tabel 9. Rerata jumlah ruas metatarsus yang telah mengalami penulangan pada fetus dari induk setelah diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Jumlah fetus yang diamati (ekor)	Jumlah penulangan metatarsus (ruas)
I	0	30	3,00 ^a
II	40	29	3,30 ^a
III	80	27	2,43 ^b
IV	120	20	2,32 ^b

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Analisis statistik dengan Anava menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) jumlah ruas metatarsus yang mengalami penulangan

antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Penulangan metatarsus disajikan pada gambar 8.



Gambar 8. Fotomikrograf tungkai belakang fetus mencit akibat kafein
 A. penulangan metatarsus 3 ruas
 B. penulangan metatarsus 2 ruas Perbesaran 16x
 Keterangan: 1. Tibia 2. Fibula 3. Metatarsus

Hambatan pertumbuhan dan perkembangan tulang yang terjadi dalam penelitian ini dimungkinkan berkaitan dengan adanya hambatan mitosis pada sel-sel yang berperan dalam osteogenesis, yaitu kondrosit dan osteoblas. Hambatan yang terjadi melalui mekanisme cAMP yang mengontrol mitosis.

Pozner dkk. (1986) menyatakan bahwa pertumbuhan sel berhubungan dengan konsentrasi cAMP. Adanya reduksi konsentrasi cAMP biasanya diikuti dengan meningkatnya aktivitas pertumbuhan, sebaliknya peningkatan konsentrasi cAMP di dalam sel dan jaringan akan menurunkan tingkat pertumbuhan sel, dan pada peningkatan konsentrasi cAMP yang tinggi dapat menyebabkan hambatan akselerasi pertumbuhan. Kenyataan ini terjadi karena kafein mampu melewati sawar plasenta dan masuk ke dalam cairan intraseluler (Sawynok & Yaksh, 1993). Selain itu, menurut Beck & Urbano (1991), kafein mampu menghambat aktivitas enzim fosfodiesterase yang menghidrolisis cAMP, sehingga perusakan cAMP

tertunda yang akhirnya terjadi peningkatan konsentrasi cAMP di dalam sel dan jaringan fetus.

4. Kosta dan Vertebrae

Pengamatan terhadap jumlah kosta pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan semua fetus memiliki kosta sebanyak 13 ruas yang terdiri atas kosta vera yaitu kosta yang melekat langsung pada sternum sebanyak 6, kosta spuria yakni kosta yang melekat pada kosta di sebelah atasnya sebanyak 3 dan kosta flunctuantes yakni kosta yang tidak melekat pada kosta di atasnya sebanyak 4.

Pada kelompok perlakuan IV (dosis 120 mg/kg bb/hari) dijumpai 3 ekor fetus (15%) yang memiliki “jembatan kosta” (Tabel 10). “Jembatan kosta” adalah penulangan yang terjadi pada kosta yang menghubungkan antara kosta yang satu dengan kosta yang lainnya. Terbentuknya “jembatan kosta” bisa sebagai kelainan dalam perkembangan skeleton fetus.

Tabel 10. Frekuensi jumlah fetus dengan “jembatan kosta” dari induk setelah diberi kafein secara oral selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Jumlah fetus yang diamati (ekor)	Jumlah fetus dengan “jembatan kosta” (ekor)	Cacat (%)
I	0	30	0	0
II	40	29	0	0
III	80	27	0	0
IV	120	20	3	15

Analisis statistik dengan uji Kai kuadrat menunjukkan ada perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara fetus normal dari kelompok kontrol dengan fetus cacat berupa “jembatan kosta” dari kelompok perlakuan IV.

Terbentuknya “jembatan kosta” pada penelitian ini menunjukkan adanya ketidaknormalan dalam perkembangan kosta selama organogenesis. Taylor (1986) menyatakan bahwa ketidaknormalan pada kosta merupakan petunjuk adanya aktivitas teratogenik suatu agensia teratogen yang diberikan pada dosis tertentu.

Mekanisme seluler dan molekuler terbentuknya “jembatan kosta” diduga karena adanya gangguan mitosis dalam proses pembentukan kosta, karena kafein menurut Beck & Urbano (1991), memiliki kemampuan menurunkan aktivitas enzim polimerase ADN dan menginduksi mitosis sebelum replikasi ADN berakhir pada fase sintesis.

Menurut Albert dkk. (1994), semua sel perlu menggandakan materi genetiknya dengan cermat sebelum membelah diri. Biosintesis ADN ini terjadi pada fase S dari siklus sel, dikatalisis oleh enzim polimerase ADN. Enzim ini berfungsi mempolimerisasikan nukleotida-nukleotida. Dalam proses biosintesis ADN ini enzim polimerase ADN harus bekerja dengan cermat dan cepat. Jika aktivitas enzim ini menurun akibat kafein (Beck & Urbano, 1991), maka biosintesis ADN terhambat. Diduga hambatan ini berupa terhambatnya atau menjadi tidak urutnya proses penjalinan urutan nukleotida ADN oleh pasangan basa komplementer menjadi urutan asam nukleat komplementer.

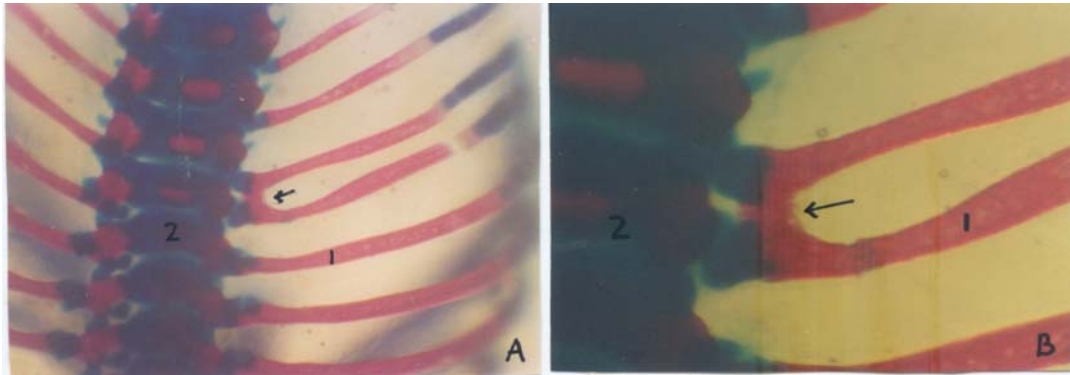
Kemungkinan lain adalah terhambatnya proses pemisahan jalin ADN dari pilinan ADN sehingga tidak terjadi pasangan basa baru. Seperti diketahui, selama biosintesis ADN, setiap jalin ADN yang lama berperan sebagai cetakan untuk pembentukan jalin baru. Akibatnya terjadi reduksi

biosintesis ADN, atau biosintesis ADN belum selesai dengan sempurna. Akibat biosintesis ADN yang belum sempurna ini adalah penggandaan kromosom menjadi terganggu, sintesis ARN juga terganggu, yang akhirnya dapat terbentuk jenis protein baru atau protein asing.

Kelainan berupa “jembatan kosta” diduga terjadi karena gangguan pengekspresian gen, sehingga terbentuk jenis protein baru untuk pembentukan “jembatan kosta”. Protein baru ini dapat menjadikan berkurang atau hilangnya protein asal sehingga mengacaukan proses organogenesis. Jika sintesis protein asal dipergunakan untuk penulangan kosta yang normal, maka dengan adanya jenis protein baru ini akan mengacaukan penulangan kosta yang terwujud dalam bentuk cacat berupa terbentuknya “jembatan kosta” (Gb. 9).

Hasil pengamatan terhadap struktur columna vertebralis fetus mencit dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan adanya deretan vertebrae dari posterior basis cranium sampai dengan ujung ekor. Setiap vertebrae terdiri atas centrum, arcus dan processus. Columna vertebralis dapat dibedakan atas vertebrae cervicallis yang terdiri atas 7 ruas. Vertebra thoracalis terdiri atas 13 ruas, vertebra lumbalis 6 ruas dan vertebra sacrocaudalis. Vertebra lumbalis lebih besar serta kuat dan lebih panjang dari vertebra lainnya.

Pusat penulangan pada vertebrae cervicallis ada dua ruas di sisi kanan dan kiri yang disebut pusat ossifikasi lateral, sedang vertebrae thoracalis, lumbalis, dan sacrocaudalis disamping pusat osifikasi lateral juga memiliki pusat ossifikasi sentral. Pada penelitian ini tidak ditemukan cacat pada struktur vertebrae.



Gambar 9. Fotomikrograf kosta fetus akibat kafein dosis 120 mg/kg bb/hari
 Selama masa organogenesis
 Keterangan: → Jembatan kosta
 A. Perbesaran 16x B. Perbesaran 24x
 1. kosta 2. vertebra thoracalis

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Kafein yang diberikan secara oral pada induk mencit bunting selama masa organogenesis dengan dosis 120 mg/kg bb/hari dapat menyebabkan kelainan pada penampilan reproduksi berupa kematian dan resorpsi fetus, perdarahan bawah kulit, tungkai belakang torsi, dan ekor bengkok
2. Kafein yang diberikan secara oral pada induk mencit bunting selama masa organogenesis dengan dosis 120 mg/kg bb/hari dapat mempengaruhi pertumbuhan skeleton fetus, yaitu hambatan penulangan pada sternum, metacarpus, dan metatarsus serta menyebabkan terbentuknya kelainan berupa “jembatan kosta”.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya sampaikan kepada Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia Ditjen Dikti Depdiknas yang telah mendanai penelitian ini melalui Penelitian Dosen Muda pada tahun anggaran 2004.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M.Raff, K. Roberts, J.D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd Ed. Garland Publishing Inc, New York: 356.
- Asthon, C.H. 1987. Caffeine & Health. *British Medical Journal* 295 6609 : 1293-1294.
- Baillargeon, L.B. & Desrosiers. 1987. Caffeine-cigarette interaction on fetal growth. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 157:1236-40.
- Beck, S.L. & Urbano, C.M. 1991. Potentiating effect of caffeine on the teratogenicity of acetazolamide in C57BL/6J mice. *Teratology* 44 : 241-250.
- Caan, B.J. & M.K. Goldhaber. 1989. Caffeinated beverages & Low birth weight, A. case-control study. *AJPH*, 79 9: 1299-1300.
- Faisal, M.A. Santoso, H.B., Rosida, L. 2001. Efek Kafein Pada Struktur Histologi Organ Hepar dan Ren Fetus Mencit. *Laporan Penelitian*, Lembaga Penelitian Unlam, Banjarmasin.

- Foreman, J. 1998. *The caffeine habit even if not & major health risk-can be hard to break*. Boston Globe, USA.
- Gaspersz, V. 1991. *Teknik Analisis dalam Penelitian Percobaan*. Tarsito, Bandung.
- Gilbert, S.G. & D.C. Rice. 1991. The effects of in utero exposure to caffeine on infant monkeys. *Teratology* 43:498.
- Harbinson, R.D. 1980. *Teratogens*. In Cassaret & Doull's Toxicology the Basic Science of Poison 2nd ed. J.L. Cassaret & J. Doull's (eds), Mc Millan Publishing Co., New York: 224-233.
- Inouye, M. 1976. Differential staining of cartilago & bone in fetal mouse skeleton by Alcian Blue & Alizarin red S. *Congenital Anomalies* 161 3: 171-173.
- Jacobson, M.F., Goldman, A.S., & Syme, R.H. 1981. Coffe & birth defect. *Lancet* 1 : 1415-16.
- Kaufmann, M.H. 1992. *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press Limited, London.
- Kawana, K., Fujii, T.& Toyonaga, K. 1988. Synergistic effect of caffeine & calcium entry blockers in induction of cleft palate in mice. *Twenty-eighth Annual Meeting of the Japanese Teratology Society & the Second Meeting of the International Federation of Teratology Societies*, July 14-16 Kyoto Japan : 238.
- Manson J.M., Zenick, H., & Coslow, R. 1982. *Teratology Test Methode for Laboratory Animal*. In Principles & Methods of Toxicology. A.W. Hayes (Ed) vol 1: 141-184. Raven Press, New York.
- Ngatijan. 1991. *Metode Laboratorium dalam Toksikologi*. Petunjuk Laboratorium, PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Price, S.A. & L.M. Wilson, 1984. *Clinical concepts of diseases processes*, Mc Grow Hill Inc, New York: 206-230.
- Pozner, J.A.B., A.E. Papatestas, R.Fagerstrom, I. Schwartz, J.Saevitz, M.Feinberg, & A.H. Anfsea. 1986. Association of tumor differentiation with caffeine & intake in women with breast cancer, *Surgery* 100 3: 482-486.
- Sakamoto, M.K., Mima, S., Kihara, T., Matsuo, T., Yasuda, Y., & Tanimura, T. 1993. Development toxicity of caffeine in the larvae of *Xenopus laevis*. *Teratology* 47 : 189-201.
- Saleh, S. 1996. *Statistik Non Parametrik*, Edisi 2. BPFE, Yogyakarta.
- Sawynok, J. & Yaksh, T.L. 1993. Caffeine as an analgesic adjuvant : A review of pharmacology & mechanism of action. *Pharmacological Reviews* 45 1: 45-46.
- Stazi, A.V., C. Macri, C. Ricciardi, & A. Mantovani. 1992. Significance of the minor alterations of the axial skeleton in rat fetuses. A. Short review. *Cong. Anom* 23: 91-104.
- Taylor, P. 1986. *Practical teratology*, Academic Press, New York.
- Tuchmann-Duplessis, H.1975. *Drug effects on the fetus*. Vol 2. Adis Press, Sydney
- Wilson. J.G. 1973. *Environment & Birth Defects*. Academic Press Inc, London.
- Wollam, D.H.M. 1967. *Advances in teratology*. Vol 2. Logos Press, New Yor

